

## **Pretreatment Sekam Padi dengan Alkali Peroksida dalam Pembuatan Bioetanol**

**Maria Ingggrid, Catherine Yonathan, Harjoto Djojsubroto**

Jurusan Teknik Kimia Universitas Katolik Parahyangan

Jl. Ciumbuleuit No. 94, Bandung 40141

### **Abstract**

*Rice husk is one of abundant lignocellulosic waste materials in Indonesia, especially during harvesting period. Being abundant and outside the human food chain makes the rice husk a potential cellulose feedstock for value-added applications of bioethanol conversion. Prior the conversion of lignocellulosic material, a pretreatment is required to alter the structures of cellulosic substance accessible to the enzymes that convert the carbohydrate polymers into fermentable sugars. In this experiment the effect of agitation, temperature, and  $H_2O_2$  concentration to lignin disruption by alkaline peroxide pretreatment at pH 11.5 were studied. It was found that agitation at 150 RPM, where neither vortex nor dead zone was observed, showed the lowest lignin content 10.6%. The higher  $H_2O_2$  concentration up to 7.5% increased the yield of glucose, but decreased at 10%  $H_2O_2$ . No marked difference in cellulose levels was observed from pretreatment of the rice husks at 25, 35, and 45 °C. During the pretreatment some of the cellulose was transformed into soluble glucose. Hydrolysis and fermentation of the pretreated rice husks produced at least 5% (w ethanol/w husk) bioethanol.*

**Keywords:** bioethanol, pretreatment, lignocellulose

### **Pendahuluan**

Terbatasnya sumber daya minyak bumi mendorong upaya untuk mensubstitusi minyak bumi dengan bahan bakar alternatif terbarukan, antara lain bioetanol. Kebutuhan akan sumber bahan bakar terbarukan non-pangan menyebabkan pembuatan bioetanol mulai dikembangkan. Sekam padi merupakan salah satu residu pertanian yang dapat diolah menjadi bioetanol. Sekam padi terdiri dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. Menurut Taniguchi (1982), lignin berikatan kuat dengan karbohidrat, sehingga dapat menghambat hidrolisis selulosa oleh enzim. Untuk memperoleh etanol dari sekam padi diperlukan tahap *pretreatment*. Tahap *pretreatment* dilakukan untuk memecah ikatan lignin, sehingga selulosa dapat dihidrolisis oleh enzim yang dapat menghasilkan glukosa.

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh *pretreatment* alkali peroksida ( $NaOH-H_2O_2$ ), terhadap hasil *pretreatment* pada berbagai temperatur reaksi dan kecepatan pengadukan. Hasil *pretreatment* digunakan sebagai substrat pada hidrolisis enzimatis dengan menggunakan selulase, kemudian difermentasi oleh *Saccharomyces cereviceae*. Dengan mempelajari tahap *pretreatment* diharapkan *pretreatment* dapat meningkatkan produksi etanol dari bahan lignoselulosa.

### **Landasan Teori**

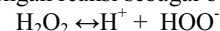
Dari proses penggilingan padi biasanya diperoleh sekam sekitar 20-30% dari bobot awal gabah. Sekam

padi terdiri dari selulosa, hemiselulosa, lignin, protein kasar, dan abu yang mengandung banyak silika (Shacklady, 1983).

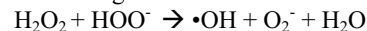
Untuk mengolah sekam padi menjadi bioetanol perlu dilakukan tiga tahap, yaitu *pretreatment*, hidrolisis enzimatis dan fermentasi.

*Pretreatment* dapat dilakukan dengan berbagai metode. Dalam penelitian ini, *pretreatment* kimia sekam padi dilakukan secara oksidatif menggunakan alkali peroksida. Menurut Hendriks (2009), metode alkali peroksida memiliki beberapa kelebihan, yaitu: bisa digunakan untuk bahan berlignin tinggi, salah satunya adalah sekam padi, dan tidak menghasilkan furfural ataupun Hidroksimetil furfural (HMF).

Gould menyatakan bahwa pada reaksi *pretreatment* dengan  $H_2O_2$ , reaksi sangat bergantung pada pH. Pada pH 11,5-11,6, Hidrogen Peroksida akan terdisosiasi dengan reaksi sebagai berikut:



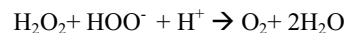
Anion Hidroperoksi ( $HOO^-$ ) dapat bereaksi dengan  $H_2O_2$  yang tidak terdisosiasi membentuk radikal Hidroksil ( $\bullet OH$ ) yang sangat aktif dan Superoksida ( $O_2^-$ ) dalam reaksi sebagai berikut:



Dalam kondisi tanpa adanya reaktan lain, hidroksil dan Superoksida bereaksi membentuk  $O_2$  dan air:



Reaksi umum Hidrogen Peroksida dalam kondisi basa, yaitu:



Dekomposisi  $H_2O_2$  tersebut selanjutnya akan menghasilkan  $\bullet OH$  yang merupakan pengoksidasi lignin.

### Metodologi

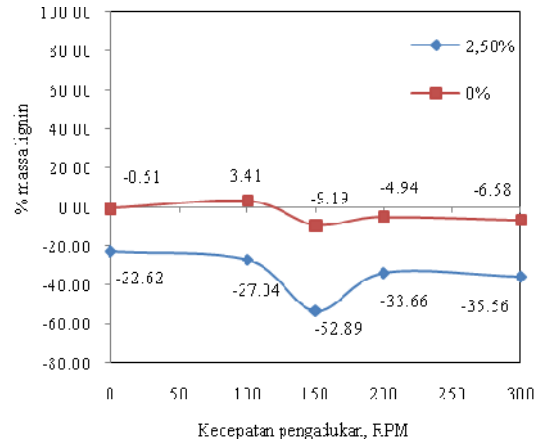
**Pretreatment.** Pada tahap ini dilakukan penentuan pengaruh kecepatan pengadukan dan penentuan pengaruh konsentrasi  $H_2O_2$  dan temperatur. *Pretreatment* menggunakan 40 gram sekam padi dalam 2 L larutan  $H_2O_2$  pada pH 11,5  $\pm 0,2$  selama 6 jam (Gould, 1987). Percobaan pengaruh kecepatan pengadukan menggunakan  $H_2O_2$  0% dan 2,5% pada suhu 35 °C dengan variasi kecepatan pengadukan 0, 100, 150, 200, dan 300 rpm. Percobaan penentuan pengaruh konsentrasi  $H_2O_2$  dan temperatur dilakukan dengan variasi konsentrasi  $H_2O_2$  0%, 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10% dan variasi temperatur 25 °C, 35 °C, dan 45 °C. Pada percobaan ini, pengadukan tidak dilakukan. Padatan hasil *pretreatment* dianalisa kandungan lignin dan selulosanya. Analisa selulosa menggunakan metode Norman-Jenkins, sedangkan analisa lignin menggunakan metode Klason. Kemudian, padatan dihidrolisis secara enzimatik.

**Hidrolisis enzimatik.** Hidrolisis menggunakan selulase Novozyme Cellusoft-L sebanyak 0,12 mL/gram sekam pada temperatur 50 °C dan pH  $\pm 4,8$  selama 72 jam. Substrat yang digunakan sebanyak 1 gram di dalam 10 mL medium buffer sitrat. Hidrolisat dianalisa kandungan glukosanya dengan metode Nelson-Somogyi. Hasil *pretreatment* yang memiliki kandungan glukosa tertinggi dianggap sebagai hasil terbaik. Hasil terbaik difermentasi dan dianalisa kandungan etanolnya.

**Fermentasi.** Fermentasi dilakukan dengan menggunakan *Fermipan* pada suhu 33 °C dan pH 5 (Tyson, 1989). Hasil fermentasi dipisahkan dengan distilasi sederhana. Lalu, hasil fermentasi dianalisa dengan menggunakan metode spektrofotometri dan *Gas Chromatography* (GC).

### Hasil dan Pembahasan

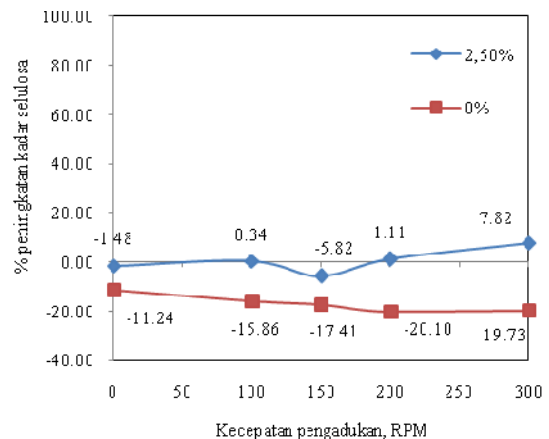
**Percobaan penentuan pengaruh pengadukan.** Pengadukan menggunakan *paddle* karena memiliki luas penampang paling besar, sehingga dengan kecepatan pengadukan yang kecil dapat memberikan efek pengadukan yang besar. Gambar 1 merupakan grafik peningkatan kadar lignin terhadap kadar lignin awal (22,50 %)



**Gambar 1.** Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap peningkatan kadar lignin

Berdasarkan pengamatan gambar 1 dan uji statistik ANOVA, pengadukan berpengaruh pada kadar lignin. Pada kecepatan 150 rpm kadar lignin paling rendah karena tidak terjadi *dead zone* (pada 0 dan 100 rpm) dan *vortex* (pada 300 rpm), sehingga kontak radikal  $\bullet OH$  dengan sekam padi baik. Kontak yang baik mengakibatkan ikatan lignin yang putus lebih banyak.

Gambar 2 merupakan grafik peningkatan kadar selulosa terhadap kadar selulosa awal (64,46 %).

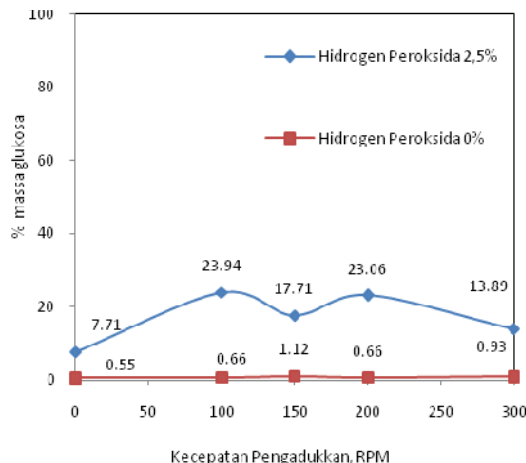


**Gambar 2.** Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap peningkatan kadar selulosa

Berdasarkan pengamatan gambar 2 dan uji statistik ANOVA, pengadukan berpengaruh pada kadar selulosa. Pada saat  $H_2O_2$  2,5% 150 rpm seharusnya kadar selulosa meningkat karena kadar lignin turun. Sebab, dengan basis 100% saat kadar lignin menurun (ada lignin yang hilang), maka kadar selulosa naik (meski jumlahnya tetap). Tetapi, pada percobaan, kadar selulosa turun karena saat ikatan

lignin berusaha dipecahkan, ada sebagian selulosa yang ikut rusak.

Dari gambar 1 dan 2, pengaruh pengadukan terhadap selulosa dan glukosa tidak terlalu besar. Selain dari perubahan kadar selulosa dan lignin, pengaruh pengadukan dapat diamati dari kadar glukosa yang dihasilkan



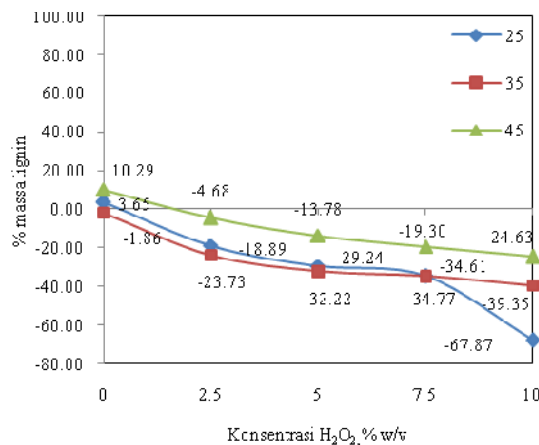
**Gambar 3.** Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap kadar glukosa

Berdasarkan pengamatan gambar 3 dan uji statistik ANOVA, pengadukan berpengaruh pada kadar glukosa. Pengadukan meningkatkan kadar glukosa dari 7,71% hingga 23,94%. Semakin besar kecepatan pengadukan, maka kadar glukosa akan meningkat, tetapi kadar glukosa mulai menurun drastis pada kecepatan 300 rpm. Pada kecepatan 150 rpm, kadar glukosa juga mengalami penurunan, yaitu dari 23,94% (gambar 3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5% 100 rpm) menjadi 17,71%. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, Pada kecepatan 150 rpm, kadar selulosa menurun, sehingga kadar glukosa yang dihasilkan turun.

Dari gambar 1, 2, dan 3, dapat diamati bahwa pada konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,5% memiliki kadar lignin lebih rendah, kadar selulosa dan kadar glukosa yang lebih tinggi. Sedangkan, kadar glukosa pada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0% sangat sedikit (0,05-1,12%). Ini menunjukkan *pretreatment* dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebih baik daripada tanpa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selain itu, dapat diketahui juga bahwa kadar selulosa dan lignin berpengaruh pada kadar glukosa yang dihasilkan saat hidrolisis enzimatis. Bila semakin sedikit kandungan lignin dan semakin banyak kandungan selulosa yang dimiliki, maka semakin banyak glukosa yang dihasilkan.

**Percobaan penentuan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan temperatur.** Dari percobaan dengan memvariasikan konsentrasi hidrogen peroksida dan temperatur reaksi diperoleh hasil analisa lignin yang dapat dilihat pada gambar 4. Gambar 4 merupakan grafik besar perubahan kadar lignin setelah *pretreatment* terhadap kadar lignin awal sebelum *pretreatment*.

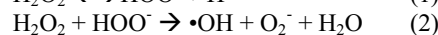
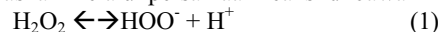
Pada grafik, hasil bernilai negatif menunjukkan adanya penurunan kadar lignin.



**Gambar 4.** Pengaruh Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan Temperatur Terhadap Peningkatan Kadar Lignin

Berdasarkan gambar 4 dan uji statistik ANOVA, peningkatan konsentrasi menyebabkan penurunan kadar lignin. Semakin banyak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ikatan lignin yang putus semakin banyak.

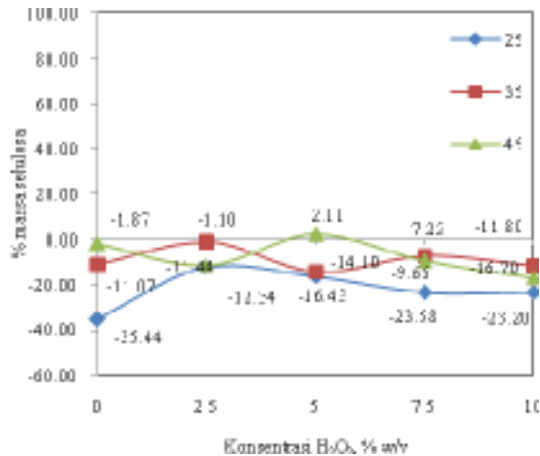
Pengaruh konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap kadar lignin dapat dijelaskan melalui persamaan reaksi di bawah ini:



Reaksi pembentukan radikal  $\bullet\text{OH}$  dipengaruhi oleh banyaknya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bila jumlah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diperbanyak dengan meningkatkan konsentrasi, maka jumlah radikal  $\bullet\text{OH}$  akan semakin banyak. Semakin banyak jumlah  $\bullet\text{OH}$ , semakin banyak pula  $\bullet\text{OH}$  yang menyerang ikatan lignin, sehingga semakin banyak ikatan lignin yang putus. Lignin yang putus akan larut di dalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Setelah selesai *pretreatment*, larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang mengandung lignin dibuang, sementara padatan sekam padi diambil. Oleh sebab itu, hasil analisa lignin sekam padi setelah *pretreatment* menunjukkan adanya penurunan kadar lignin.

Selain itu, temperatur reaksi berpengaruh terhadap kadar lignin. Namun, perubahan temperatur (dari 25 °C hingga 45 °C) tidak banyak mengubah persen lignin karena rentang suhu tersebut terlalu kecil, sehingga perubahan kadar lignin kecil. Dari gambar 4 dapat diamati bahwa kadar lignin pada suhu 35 °C lebih rendah daripada kadar lignin pada suhu 25 °C. Hal ini disebabkan pada 35 °C, energi kinetik molekul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lebih besar, sehingga kemungkinan bertumbukan lebih besar. Akibatnya, reaksi pemutusan ikatan lignin menjadi lebih cepat, sehingga menurunkan kadar lignin lebih banyak dibandingkan pada 25 °C dalam waktu yang sama. Tetapi, kadar lignin 45 °C justru lebih rendah dibandingkan pada 35 °C. Pada suhu 45 °C, kenaikan suhu mulai mempengaruhi reaksi ketetapan dekomposisi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (persamaan reaksi 1). Jika suhu

dinaikkan, maka reaksi akan bergerak ke salah satu sisi. Jika reaksi bergerak ke salah satu sisi, maka jumlah  $H_2O_2$  dan ion  $HOO^\cdot$  menjadi tidak sama. Radikal  $\bullet OH$  yang terbentuk menjadi tidak sebanyak saat temperatur 25 dan 35 °C. Menurunnya jumlah radikal  $\bullet OH$  menyebabkan ikatan lignin yang putuspun berkurang.



**Gambar 5.** Grafik percobaan penentuan pengaruh kecepatan pengadukan terhadap peningkatan kadar selulosa

Dari gambar 5 dan uji statistik ANOVA dapat diketahui bahwa konsentrasi  $H_2O_2$  dan temperatur berpengaruh signifikan terhadap kadar selulosa. Jika dilihat dari gambar 5, maka dapat diamati bahwa kadar selulosa naik turun sepanjang peningkatan konsentrasi  $H_2O_2$ . Hal ini disebabkan oleh radikal  $\bullet OH$  tidak selektif dalam menyerang ikatan lignoselulosa.<sup>[6]</sup> Saat awal reaksi, radikal  $\bullet OH$  mematahkan ikatan lignin-selulosa, sehingga struktur lignin yang membungkus struktur selulosa mulai terbuka sebagian. Bagian yang terbuka tersebut menyebabkan radikal lebih mudah berkontak dengan selulosa. Bila radikal berkontak dengan selulosa, radikal dapat memutuskan ikatan selulosa, sehingga terbentuk glukosa. Jadi, saat *pretreatment* terdapat dua kemungkinan reaksi lignoselulosa, yaitu: pemutusan ikatan lignin dan degradasi selulosa. Glukosa hasil degradasi selulosa akan larut di dalam larutan  $H_2O_2$  saat *pretreatment*. Oleh sebab itu, adanya reaksi degradasi selulosa dapat dibuktikan dengan melakukan analisa glukosa pada larutan  $H_2O_2$  sisa *pretreatment*. Analisa dilakukan hanya pada *run* konsentrasi  $H_2O_2$  7,5% dan temperatur 45 °C yang digunakan sebagai contoh. Dari hasil analisa diperoleh kandungan glukosa sebesar 8,98 ppm dalam 2 L larutan  $H_2O_2$ . Pada saat hidrolisis enzimatik, cairan tersebut tidak digunakan, melainkan langsung dibuang.

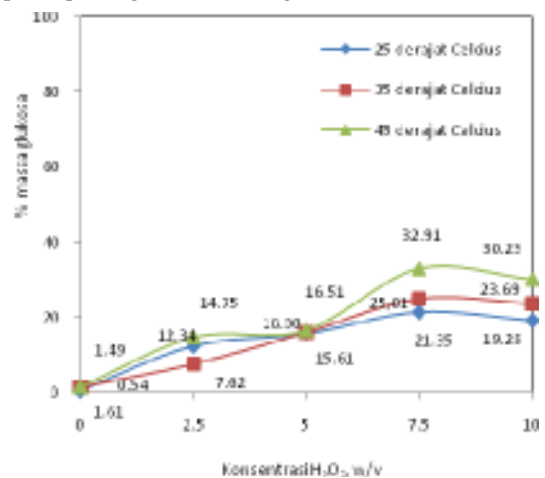
Hidrolisis enzimatik menggunakan padatan sekam yang telah dipretreatment, sehingga memiliki kandungan selulosa yang tidak optimal. Selulosa

pada padatan tidak maksimal karena sebagian selulosa telah menjadi glukosa yang larut dalam larutan  $H_2O_2$  yang dibuang.

Data selulosa yang naik turun kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, kadar selulosa awal di setiap *run* berbeda-beda. Sedangkan, di dalam perhitungan peningkatan kadar selulosa, besar peningkatan tersebut dihitung menggunakan kadar awal selulosa yang sama untuk setiap *run*. Analisa kadar selulosa awal tersebut dilakukan hanya sekali sebelum percobaan *pretreatment* dilakukan. Sampel yang digunakan bukan merupakan sampel yang digunakan untuk setiap kali percobaan *pretreatment*.

Kedua, analisa selulosa menggunakan metode Norman-Jenkins. Metode ini dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan  $Na_2SO_3$  dan  $NaClO$ . Reaksi tersebut dilakukan berulang-ulang kali hingga warna ungu saat pemanasan dengan  $Na_2SO_3$  tidak terbentuk (indikasi adanya lignin). Pengulangan tahap tersebut berupa filtrasi, pembilasan sampel, dan pemindahan sampel yang dilakukan berkali-kali dengan spatula, sehingga terkadang ada sampel yang jatuh atau tertinggal di dalam kertas saring. Hal tersebut bisa menyebabkan analisa menjadi kurang akurat karena kadar selulosa yang diperoleh menjadi lebih kecil dibandingkan dengan kadar selulosa sebenarnya.

Jika grafik 1 hingga 5 diamati, maka dapat dilihat pengaruh variasi pengadukan, konsentrasi  $H_2O_2$ , dan temperatur lebih mudah dilihat saat analisa kadar glukosa karena perubahannya lebih besar daripada perubahan lignin dan selulosa. Lagipula, dalam pembuatan bioetanol yang memiliki peran penting adalah kadar glukosa.



**Gambar 6.** Pengaruh Konsentrasi Hidrogen Peroksida Terhadap Kadar Glukosa

Dari gambar 6 dan hasil uji statistik ANOVA dapat dipastikan bahwa temperatur dan konsentrasi  $H_2O_2$  berpengaruh terhadap kadar glukosa yang dihasilkan.

Pada gambar 6, semakin tinggi konsentrasi  $H_2O_2$ , maka glukosa yang dihasilkan semakin meningkat, tetapi menurun pada konsentrasi  $H_2O_2$  10%. Sedangkan, perubahan temperatur operasi dari 25 °C hingga 45 °C tidak berpengaruh besar terhadap kadar selulosa.

Ketika konsentrasi  $H_2O_2$  diperbesar, kadar lignin akan turun (gambar 4). Lignin menghambat kerja enzim untuk memecah selulosa menjadi glukosa. Ketika kadar lignin turun, kerja enzim menjadi lebih mudah karena penghalangnya sudah berkurang. Oleh sebab itu, pada gambar 6, semakin besar konsentrasi, kadar glukosa semakin tinggi.

Namun, bila melihat gambar 5, maka dapat diketahui pada saat kadar glukosa naik, kadar selulosa tidak selalu naik. Padahal, glukosa merupakan hasil konversi selulosa. Hal ini disebabkan selulosa yang ada dalam sampel belum tentu sudah terbebas dari lignin. Bila jumlah selulosanya banyak, tetapi masih banyak struktur lignin yang menghalangi, maka kadar glukosa yang dihasilkan tidak akan setinggi kadar selulosa yang telah bebas dari lignin. Jadi, bila kadar selulosanya lebih rendah, tetapi kadar ligninnya rendah, maka bisa saja kadar glukosa yang dihasilkan lebih banyak karena selulosa yang bisa diubah menjadi glukosa lebih banyak.

Dalam pembuatan bioetanol, kadar glukosa yang tinggi akan menghasilkan kadar etanol yang lebih tinggi pula. Sehingga, dari grafik 6 dapat dilihat bahwa perolehan glukosa terbaik (32,91%) yaitu saat *pretreatment*  $H_2O_2$  7,5% dan suhu 45°C.

Hasil terbaik tersebut kemudian difermentasi dengan ragi. Hasilnya dianalisa menggunakan metode spektrofotometri dan GC atau *gas chromatography*. Sampel masih mengandung ragi dan pengotor lainnya, sehingga sampel harus didistilasi untuk mendapatkan kandungan etanol dan sedikit air yang mungkin terbawa. Dari hasil perhitungan diperoleh hasil etanol sebesar 4% (gr etanol/gram sekam) atau 19,31 mg etanol/mL (analisa spektrofotometri) dan 5% (gr etanol/gram sekam) atau 29,5 mg etanol/mL (analisa *gas chromatography*/GC). Kesalahan yang terjadi dalam analisa etanol kemungkinan disebabkan oleh sifat etanol yang mudah menguap, sehingga kadarnya berkurang. Selain itu, kadar etanol yang sangat kecil semakin dapat memperbesar kesalahan dalam analisa spektrofotometri. Sedangkan, untuk kadar etanol yang kecil, metode GC lebih akurat. Hal ini yang menyebabkan adanya selisih hasil perhitungan menggunakan GC dengan spektrofotometri.

Selain itu, saat distilasi faktor *azeotrop* dan bocornya etanol saat distilasi perlu diperhitungkan. *Azeotrop* etanol-air terjadi pada konsentrasi sekitar 89%-mol etanol dan 11%-mol air atau pada campuran sekitar 96%-v/v etanol dan 4%-v/v pada temperatur 351 K dan tekanan 1 atm.<sup>[68]</sup> *Azeotrop* terjadi pada konsentrasi etanol yang tinggi. Dalam

percobaan ini, konsentrasi etanol sangat rendah, jadi hasil distilasi belum mencapai *azeotrop*. Tetapi bila distilasi mencapai *azeotrop*, maka konsentrasi etanol yang diperoleh hanya mencapai 96%-v/v. Peningkatan kemurnian etanol dapat dilakukan dengan metode lain, misalnya distilasi fraksional atau dengan metode pemisahan lainnya.

Etanol yang keluar dari sambungan alat distilasi bisa mengurangi kadar etanol. Kebocoran diantisipasi dengan melapisi sambungan alat dengan *cling wrap*. Oleh karena adanya kemungkinan kesalahan saat distilasi (kadar etanol yang dianalisa menjadi lebih kecil dari yang seharusnya), maka kadar etanol hasil analisa merupakan kadar etanol minimum yang bisa dihasilkan. Jika, distilasi dapat dilakukan dengan cara yang lebih teliti, maka kadar etanol dari hasil distilasi tersebut dapat lebih tinggi.

Hasil etanol (19,31 mg etanol/mL - 29,5 mg etanol/mL) dapat dikatakan cukup baik.

## Kesimpulan

Hasil *pretreatment* alkali peroksida terbaik ( $H_2O_2$  7,5%, suhu 45 °C) menghasilkan etanol minimal 4%-5%-w/w. Pengadukan tidak berpengaruh besar terhadap kadar selulosa dan lignin sekam padi, tetapi berpengaruh pada kadar glukosa yang dihasilkan. Sedangkan, hasil glukosa dari variasi konsentrasi  $H_2O_2$  0%, 2,5%, 5%, hingga 7,5% mengalami peningkatan, tetapi turun pada konsentrasi  $H_2O_2$  10%

Peningkatan suhu dari 25°C, 35°C, dan 45°C cenderung menaikkan sedikit kadar glukosa dan selulosa. *Pretreatment* alkali peroksida masih memiliki kekurangan, yaitu ada selulosa yang terdegradasi menjadi glukosa, lalu larut di dalam sisa larutan *pretreatment*.

## Daftar Pustaka

- Ayunanda, Neneng, 2009, *Sintesis Zeolit ZSM-5 Dari Abu Sekam Padi Tanpa Templat Organik: Pengaruh Waktu Kristalisasi*, Undergraduate Thesis, Institute Teknologi Sepuluh Nopember, 27 Januari 2010
- Hendriks, A.T.W.M, G. Zeeman, 2009. *Pretreatment to Enhance The Digestibility of Lignocellulosic Biomass*, Wageningen University, www.che.ncsu.edu, 25 Desember 2010
- Isroi, 2008. *Produksi Bioethanol Berbahan Baku Biomassa Lignoselulosa*, isroi. wordpress.com, 21 Januari 2010
- M. Gould, John, 1987, *Alkaline Peroxide Treatment Of Nonwoody Lignocellulosics*, U.S. Patent 4,649,113
- M. Gould, John, 1984, *Studies On The Mechanism Of Alkaline Peroxide Delignification Of Agricultural Residues*, U.S Department of Agricultural, 22 Maret 2010

Shacklady, Cyril A., 1983. *The Use of Organic Residues In Rural Communities*, The United Nation University, www.unu.edu, 13 April 2010  
Taniguchi, Masayuki, dkk. *Evaluation of Chemical Pretreatment for Enzymatic Solubilization of*

*Rice Straw*, European Journal of Applied Microbiology and Bioetchnology, Departement of Food Science and Technology of Kyoto University, 27 Januari 2010  
Tyson, George J., 1989. *Delignification Of Non-woody Biomass*, U.S Patent 5,023,097